

EXHIBIT 5



DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIEE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS (PCT)

(51) Classification internationale des brevets 6 : C07D 493/22, A61K 31/365 // (C07D 493/22, 307:00, 307:00, 307:00, 307:00)		A1	(11) Numéro de publication internationale: WO 99/52911 (43) Date de publication internationale: 21 octobre 1999 (21.10.99)
(21) Numéro de la demande internationale: PCT/FR99/00794		(81) Etats désignés: AE, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW, brevet ARIPO (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SL, SZ, UG, ZW), brevet eurasien (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), brevet européen (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), brevet OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).	
(22) Date de dépôt international: 6 avril 1999 (06.04.99)			
(30) Données relatives à la priorité: 98/04585 10 avril 1998 (10.04.98) FR			
(71) Déposant (pour tous les Etats désignés sauf US): CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE (CNRS) [FR/FR]; 3, rue Michel Ange, F-75016 Paris (FR).		Publiée Avec rapport de recherche internationale.	
(72) Inventeurs; et (75) Inventeurs/Déposants (US seulement): PIETRI, Sylvia [FR/FR]; 18, allée Léo Delibes, Touret de Vallier, F-13500 Martigues (FR). FINET, Jean-Pierre [FR/FR]; Mas les Oivades, Chemin de Boussicaut, F-13280 Raphèle les Arles (FR). LIEBGOTT, Thibaud [FR/FR]; 14, rue Lautard, F-13003 Marseille (FR). CULCAS, Marcel [FR/FR]; Vallon du Pauvre Homme, Allée de la Marjolaine, F-13500 Martigues (FR). HENRIET, Christiane [BE/FR]; Chemin de l'Ecole, Moulin de Redor, F-13390 Auriac (FR).			
(74) Mandataire: MONCHENY, Michel; Cabinet Lavoix, 2, place d'Estienne d'Orves, F-75441 Paris Cedex 09 (FR).			
(54) Titre: GINKGOLIDE DERIVATIVES, PREPARATION METHOD AND PHARMACEUTICAL COMPOSITIONS CONTAINING THEM			
(54) Titre: DERIVES DE GINKGOLIDES, LEUR PROCEDE DE PREPARATION ET COMPOSITIONS PHARMACEUTIQUES LES CONTENANT			
(57) Abstract			
<p>The invention concerns firstly a compound of general formula (I) wherein: R₁ represents a hydrogen atom or an hydroxyl group; R₂ represents a C₅-C₁₂ aromatic group comprising, if required, one or several heteroatoms selected among oxygen, nitrogen, sulphur and optionally substituted by one or several groups selected among: halogen atoms such as fluorine, chlorine, bromine or iodine; hydroxyl, linear or branched C₁-C₇ alkyl, linear or branched C₁-C₇ alkoxy, C₂-C₆ alkenyl groups; (CH₂)_nX group with n representing an integer between 0 and 5 and X representing a group selected among: NR₃R₄ with R₃ and R₄ representing independently of each other a hydrogen atom, a C₁-C₇ alkyl group or a phenyl group; the groups CN, CHO, CF₃, SR₅ with R₅ representing a hydrogen atom, a C₁-C₆ alkyl group or a phenyl; a group OR₆ with R₆ corresponding to the definition of R₃ or representing a P(O)(OR₇)(OR₈) group with R₇ and R₈ representing independently of each other a hydrogen atom or a C₁-C₇ alkyl group.</p>			
(57) Abrégé			
<p>La présente invention a pour premier objet un composé de formule générale (I) dans laquelle: R₁ représente un atome d'hydrogène ou un groupement hydroxyle, R₂ représente un groupement aromatique en C₅ à C₁₂ comprenant le cas échéant un ou plusieurs hétéroatomes choisis parmi l'oxygène, l'azote, le soufre et éventuellement substitué par un ou plusieurs groupements choisis parmi les: atomes d'halogène comme le fluor, le chlore, le brome et l'iode; groupements hydroxyle, alkyle en C₁ à C₇ linéaire ou ramifié, alkoxy en C₁ à C₇ linéaire ou ramifié, alcényle en C₂ à C₆; groupement (CH₂)_nX avec n représentant un entier compris entre 0 et 5 et X représentant un groupement choisi parmi: NR₃R₄ avec R₃ et R₄ représentant indépendamment l'un de l'autre un atome d'hydrogène, un groupement alkyle en C₁ à C₇, ou un groupement phényle; les groupements CN, CHO, CF₃, SR₅ avec R₅ représentant un atome d'hydrogène, un groupement alkyle en C₁ à C₆ ou un phényle, et un groupement OR₆ avec R₆ répondant à la définition de R₃ ou représentant un groupement P(O)(OR₇)(OR₈) avec R₇ et R₈ représentant indépendamment l'un de l'autre un atome d'hydrogène ou un groupement alkyle C₁ à C₇.</p>			

Applicants: Koji Nakanishi et al.

Serial No.: 10/579,162

Filed: November 9, 2004

Exhibit 5

- 1 -

"Dérivés de ginkgolides, leur procédé de préparation et compositions pharmaceutiques les contenant".

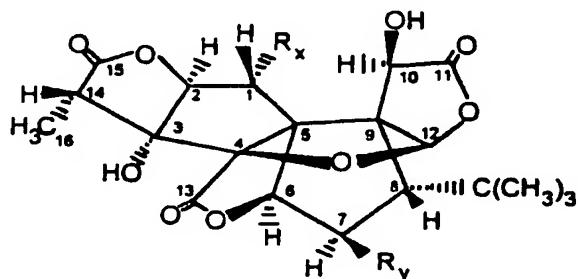
La présente invention a pour objet de nouveaux dérivés ginkgolides utiles notamment pour leurs propriétés cardioprotectrices.

L'extrait de feuille de *Ginkgo biloba*, plus particulièrement désigné sous l'appellation EGb 761, est un mélange complexe dont l'intérêt thérapeutique a aujourd'hui été démontré notamment dans le domaine cardio-vasculaire. L'EGb 761 est particulièrement efficace pour le traitement des insuffisances vasculaires (S. PIETRI et al., *Cardiovascular Drugs and Therapy* (1997), 11 ; 121-131), cérébrales et périphériques, des syndromes hypoxiques ou ischémiques, et des lésions cérébrales induites par le vieillissement (F.V. DE FEUDIS, in *Ginkgo Biloba Extract, from chemistry to the clinic*, Ed. J.-P. PRINZ ; Wiesbaden Ullstein Medical, 1998).

Parmi les substances constituant l'EGb 761 sont considérés comme les agents les plus actifs en terme pharmacologique, les flavonoïdes, dont principalement les glycosides flavonols, présents jusqu'à environ 24 % dans l'extrait et les terpènes dont plus particulièrement les ginkgolides et le bilobalide correspondant à environ 6 % de la teneur de l'extrait EGb 761.

En ce qui concerne plus particulièrement les ginkgolides, il s'agit d'un mélange des ginkgolides A, B, C et J répondant à la formule générale suivante :

20



	ginkgolide	R _x	R _y
	A	H	H
25	B	OH	H
	C	OH	OH
	J	H	OH

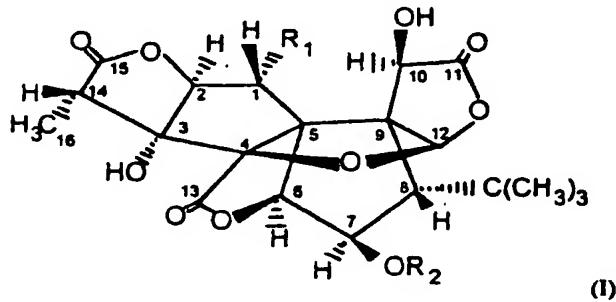
Récemment, il a été montré que la perfusion des ginkgolides A et B, à faibles doses, et plus particulièrement celle du ginkgolide A, inhibait significativement la formation des radicaux libres oxygénés qui sont généralement produits au cours de l'ischémie/reperfusion myocardique et améliorait la récupération fonctionnelle cardiaque (S. Pietri et al., J. Mol. Cell. Cardiol 29, 733-742 (1997)).

Ces composés manifestent donc un intérêt thérapeutique potentiel qu'il serait particulièrement avantageux d'optimiser en terme d'efficacité en augmentant leur activité cardioprotectrice et/ou en facilitant leur pénétration au sein des cellules à traiter.

La présente invention a précisément pour objet de proposer de nouveaux dérivés ginkgolides, apparentés aux ginkgolides naturels précités et qui soient plus performants en terme d'efficacité.

De manière inattendue, les inventeurs ont mis en évidence qu'en fonctionnalisant des ginkgolides en position 7, il était possible d'accroître leur faculté à pénétrer dans les cellules et/ou d'augmenter leur activité cardioprotectrice.

Plus particulièrement, la présente invention a pour objet un composé de formule générale I



dans laquelle :

- R₁ représente un atome d'hydrogène ou un groupement hydroxyle,
- R₂ représente un groupement aromatique en C₅ à C₁₂ comprenant le cas échéant un ou plusieurs hétéroatomes choisis parmi

l'oxygène, l'azote, le soufre et éventuellement substitué par un ou plusieurs groupements choisis parmi les :

- atomes d'halogène comme le fluor, le chlore, le brome et l'iode,
- groupements hydroxyle, alkyle en C₁ à C₇, linéaire ou ramifié,
- 5 - alkoxy en C₁ à C₇, linéaire ou ramifié, alcényle en C₂ à C₆,
- groupements (CH₂)_nX avec n représentant un entier compris entre 0 et 5 et X représentant un groupement choisi parmi :
 - NR₃R₄ avec R₃ et R₄ représentant indépendamment l'un de l'autre un atome d'hydrogène, un groupement alkyle en C₁ à C₇ ou un groupement phényle,
 - les groupements CN, CHO, CF₃, SR₅ avec R₅ représentant un atome d'hydrogène, un groupement alkyle en C₁ à C₇ ou un phényle et
 - un groupement OR₆ avec R₆ répondant à la définition de R₅ ou représentant un groupement P(O)(OR₇)(OR₈) avec R₇ et R₈ représentant indépendamment l'un de l'autre un atome d'hydrogène ou un groupement alkyle en C₁ à C₇.

10 De préférence, l'invention concerne les composés de formule générale (I) dans laquelle R₂ représente un groupement phényle, 1- ou 2-naphtyle ou biphenyle, substitués comme indiqué ci-dessus.

20 Plus préférentiellement, il s'agit de composés dans lesquels R₂ représente un groupement phényle substitué par au moins un groupement alkyle en C₁ à C₇, linéaire ou ramifié, un groupement alkoxy en C₁ à C₅ linéaire ou ramifié ou un groupement (CH₂)_nOR₆ avec n étant un entier variant de 1 à 5 et R₆ représentant un groupement P(O)(OR₇)(OR₈) dans lequel R₇ et R₈ représentent indépendamment l'un de l'autre un atome d'hydrogène ou un groupement alkyle en C₁ à C₇.

25 Selon un mode préféré de l'invention, le groupement R₁ représente dans les composés de formule générale I un groupement hydroxyle.

A titre illustratif des composés selon l'invention on peut tout particulièrement citer le 1,3,10-trihydroxy-7-(4-méthylphénoxy) ginkgolide encore dénommé 7-O-(p-tolyl)ginkgolide C, dont la préparation est décrite en exemple 2 ci-après.

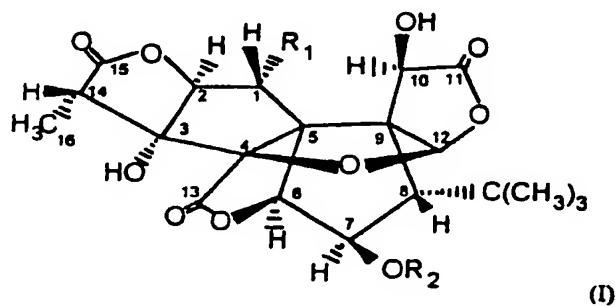
5

La présente invention a également pour objet un procédé de préparation d'un composé de formule générale I tel que défini ci-dessus.

Le procédé plus particulièrement retenu dans le cadre de la présente invention pour préparer les composés revendiqués met en œuvre une 10 arylation à l'aide d'un réactif du bismuth pentavalent. Il s'agit plus particulièrement du diacétate de triarylbismuth.

Toutefois, afin d'orienter sélectivement la réaction d'arylation au niveau de la fonction hydroxyle présente en position 7 du ginkgolide, il est au préalable nécessaire de procéder à une protection du groupement hydroxyle 15 présent en position 10 et le cas échéant en 1, qui sont plus réactifs.

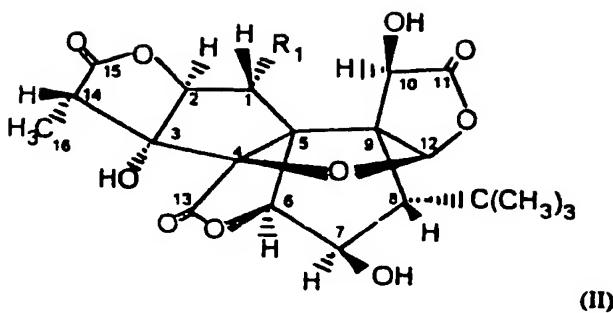
Plus précisément, la présente invention a pour second objet un procédé de préparation pour la préparation d'un composé de formule générale I



20

telle que définie ci-dessus, caractérisé en ce qu'il met en œuvre à titre de produit de départ un composé de formule générale II

5

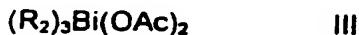


5

dans laquelle :

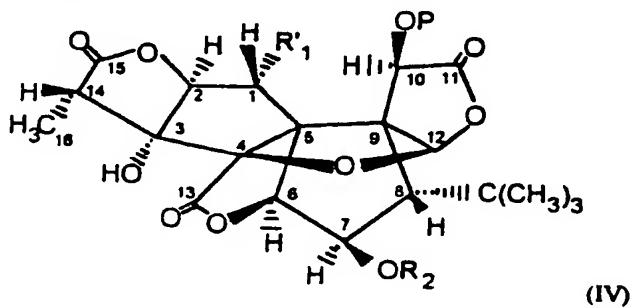
R₁ représente un atome d'hydrogène ou un groupement hydroxyle et comprend les étapes consistant à :

- protéger au moins une des fonctions hydroxyles présentes en position(s) 1 et/ou 10 par un groupement protecteur labile,
- transformer la fonction hydroxyle en position 7 dudit composé protégé obtenu à l'issue de l'étape 1 avec un diacétate de tris(aryl)bismuth de formule III



avec R₂ tel que défini ci-dessus,

- 15 dans des conditions opératoires telles que l'on obtient un composé de formule générale IV



- 20 dans laquelle R'₁ représente un atome d'hydrogène ou un groupement OP' avec P et P', identiques ou différents, représentant soit un atome d'hydrogène ou un groupement protecteur labile ou constituant

ensemble un groupement protecteur labile bifonctionnel et R₂ est tel que défini ci-dessus et

- éliminer le groupement protecteur de la fonction hydroxyle en position 1 et/ou 10 et
- 5 - isoler le composé de formule générale I attendu.

En ce qui concerne la première étape de protection de la ou des fonction(s) hydroxyle(s), plusieurs méthodes et réactifs sont à la disposition de l'homme du métier pour effectuer cette réaction.

10 A titre illustratif de ces méthodes, on peut plus particulièrement citer celle consistant à convertir au moins l'une des fonctions hydroxyle en position 1 ou 10 en un groupement alkylester. La réaction correspondante peut s'effectuer dans le diméthylformamide à une température comprise entre 15 et 50°C pendant environ 4 à 10 heures. Selon cette variante, la fonction hydroxyle 15 est protégée sous la forme d'un ester acétyle, n-butyryle, n-valéryle et l'agent protecteur utilisé est respectivement l'anhydride acétique, n-butyrique ou n-valérique.

On peut également envisager l'éthérification d'au moins une des 20 fonctions hydroxyles en position 1 ou 10 avec un groupement benzyloxyméthyle CH₂OCH₂C₆H₅ (BOM) ou un groupement tert-butyldiphénylsilyle.

Dans le cas de ce dernier composé, on met en contact le 25 composé de formule générale II avec le chlorure de tert-butyldiphénylsilyle dans un solvant polaire de type diméthylformamide DMF. La réaction de silylation est réalisée à température ambiante et sous agitation. On récupère le composé silylé attendu par hydrolyse ménagée du milieu réactionnel puis extraction organique. Il est isolé sous une forme purifiée par chromatographie.

En ce qui concerne plus particulièrement le réactif d'arylation 30 dérivé du bismuth de formule générale III, l'homme de l'art dispose de différents protocoles pour le préparer.

Par exemple, ce réactif peut être préparé par traitement du trichlorure de bismuth avec un réactif de Grignard ou avec un organolithium suivi de l'oxydation consécutive du dérivé triaryl**bismuthane** ainsi obtenu. L'oxydation de Bi^{III} en Bi^V peut être réalisée à l'aide de chlore, brome ou de SO₂Cl₂ pour conduire au dérivé triaryl**bismuthane** dihalogéné. Le traitement de ce dernier avec du carbonate de sodium puis de l'acide acétique conduit alors au réactif d'arylation attendu.

Un autre mode de préparation consiste à faire réagir le dérivé triaryl**bismuth** dihalogéné avec de l'acétate d'argent pour conduire directement 10 au diacétate de bismuth.

Une troisième variante comprend l'oxydation *in situ* du dérivé triaryl**bismuthane** en diacétate de bismuth V. Dans ce cas, on additionne 1 à 15 1,2 équivalents d'acide peracétique à une solution de triaryl**bismuthane** dans un mélange dichlorométhane/tétrahydrofurane.

Toutefois, dans le cas de la présente invention, on privilégiera 20 une variante de procédé développée récemment et consistant à oxyder des dérivés triaryl**bismuthanes** en leurs diacétates correspondants par simple traitement avec du perborate de sodium dans de l'acide acétique. Ce protocole a pour avantage d'être réalisable à température ambiante et de nécessiter un temps réactionnel réduit. Il conduit à une grande variété de dérivés arylés dans 25 lequel le groupe aryle est substitué par des groupements électrodonneurs et/ou électro-attracteurs (S. Combes et J.P. Finet, Synthetic Communications, 26(24), 4569-4575 (1996)).

La réaction d'arylation au niveau du dérivé ginkgolide est réalisée 25 par mise en présence du composé de formule générale II, dont au moins l'une des fonctions hydroxyle en position 1 ou 10 est protégée par un groupement protecteur labile, et du dérivé diacétate de tris(aryl)bismuth de formule générale III dans un solvant, non polaire ou peu polaire, en présence d'une 30 quantité catalytique efficace de cuivre, métal ou de sels de cuivre (II).

Conviennent également comme catalyseurs, les esters de cuivre (II) tels que les acylates, les sulfonates ou les halogénures.

Ce catalyseur peut être présent à une quantité comprise entre 0,01 et 0,1 équivalent.

En ce qui concerne plus particulièrement le solvant retenu pour la réaction d'arylation, il peut être choisi parmi le dichlorométhane, CH_2Cl_2 , le tétrahydrofurane, THF, le diméthylformamide, DMF, et le benzène.

Les composés de formules générales II et III sont mis en présence en quantité suffisante pour conduire à la fonctionnalisation du dérivé ginkgolide en position 7. A cet effet le réactif bismuthé est de préférence introduit à raison de 1 à 7 équivalents de composé de formule générale II protégé.

La réaction est de préférence réalisée à température ambiante et sous atmosphère inerte.

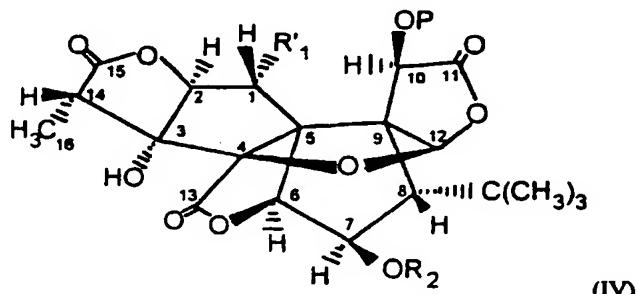
Elle peut par ailleurs s'écouler sur plusieurs jours et dure environ jusqu'à 6 jours.

15

A l'issue de la réaction, on isole le composé attendu des autres réactifs. A ses fins, on procède à une hydrolyse en milieu acide du mélange réactionnel puis à son extraction en phase organique. L'extrait organique est séché et concentré et le composé obtenu purifié par chromatographie. A l'issue de cette étape de séparation, on procède à la déprotection de la ou des fonctions hydroxyles des positions 1 et/ou 10. La méthode retenue est bien entendu fonction de la nature du groupement protecteur utilisé.

La présente invention se rapporte également aux composés de formule générale (IV)

25



dans laquelle R₁ représente un atome d'hydrogène ou un groupement OP' avec P et P', identiques ou différents, représentant soit un atome d'hydrogène ou un groupement protecteur labile ou constituant ensemble un groupement protecteur labile bifonctionnel et R₂ est tel que défini ci-dessus, à titre d'un intermédiaire de synthèse des composés de formule générale I revendiqués.

De préférence, R₂ y représente un groupement phényle substitué par au moins un groupement alkyle en C₁ à C₇ linéaire ou ramifié, un groupement alkoxy en C₁ à C₅ linéaire ou ramifié ou un groupement (CH₂)_nOR₆ avec n étant un entier variant de 1 à 5 et R₆ représentant un groupement P(O)(OR₇)(OR₈) dans lequel R₇ et R₈ représentent indépendamment l'un de l'autre un atome d'hydrogène ou un groupement alkyle C₁ à C₇. Il s'agit plus préférentiellement d'un radical 4-méthylphényle.

La perfusion d'un composé selon l'invention comme le 7-O-(p)-Tolyl)-ginkgolide C au cours d'un protocole d'ischémie/reperfusion montre que ce composé induit un effet cardioprotecteur significativement supérieur à celui d'un ginkgolide B perfusé dans les mêmes conditions.

Cet effet cardioprotecteur se traduit notamment par une diminution significative du développement de la contracture ischémique et post-ischémique et d'une amélioration significative de la récupération du travail cardiaque à la reperfusion.

En conséquence, la présente invention a également pour objet une composition pharmaceutique comprenant au moins à titre de principe actif un composé de formule générale I tel que défini précédemment. Ces compositions pharmaceutiques se révèlent tout particulièrement utiles pour leurs propriétés cardioprotectrices.

Bien entendu, les compositions pharmaceutiques revendiquées peuvent comprendre en outre d'autres excipients et/ou véhicules pharmacologiquement acceptables.

Les exemples et figures présentés ci-après sont soumis à titre illustratif et non limitatif de la présente invention.

Figures

Figure 1 : Représentation schématique du protocole expérimental sur le modèle de cœur de rat isolé perfusé avec a, b, c, d, e), définis comme suit :

- 5 a) phases de perfusion des ginkgolides testés
- b) période de contrôle normoxique
- c) phase d'ischémie partielle (-80% du flux)
- d) phase d'ischémie totale
- e) période de reperfusion.

10

EXEMPLE 1 :**Préparation du diacétate de tris(*p*-tolyl)bismuth****1) Tris (*p*-tolyl)bismuthane (1)**

15 Sous argon une solution de 20 g (0,117 mol) de 4-bromotoluène dans 160 ml de THF sec sont ajoutés à une suspension de 2,86 g (0,117 mol) de magnésium en poudre dans 20 ml de THF. Le mélange est porté à reflux pendant 1 h et ensuite sonifié pendant 0,5 h. Après refroidissement à 0°C, 11,07 g (0,035 mol) de trichlorure de bismuth sont ajoutés en 30 minutes, la 20 température étant maintenue entre 0°C et 5°C. Le mélange est alors chauffé à reflux pendant 30 minutes et agité pendant une nuit. Il est ensuite hydrolysé avec une solution aqueuse de NH₄Cl 10 % saturée en NaCl. Après séparation de la phase organique, la phase aqueuse est filtrée sur Célite, puis extraite au CH₂Cl₂. Après séchage sur MgSO₄, les extraits organiques sont concentrés. Le 25 produit brut est recristallisé dans un mélange chloroforme-éthanol à 15°. On récupère 8 g de 1 sous forme d'un solide blanc. Rdt 43 %, P_{ms.}: 117°C.

2) Diacétate de tris(*p*-tolyl)bismuth (2)

30 Un mélange de 1,86 g (18,66 mmol) de perborate de sodium monohydraté, 3 g (6,22 mmol) de tris (*p*-tolyl)bismuthane 1 dans 65 ml d'acide acétique est agité à température ambiante pendant 1 h. Le mélange réactionnel est alors versé dans 100 ml d'eau et extrait au CH₂Cl₂ (3 fois

50 ml). Les extraits organiques sont lavés avec de l'eau, séchés sur MgSO₄ et concentrés jusqu'à un faible volume auquel on ajoute 100 ml d'éther ; la solution est gardée à -15°C pendant une nuit. Après filtration, le solide est recristallisé dans un mélange dichlorométhane-pentane. On récupère 2,64 g de
5 (2) sous-forme de cristaux légèrement jaunes. Rdt. 71 % ; P_{mel.} : 172°C.

EXEMPLE 2 :

Préparation du 7-O-(p-Tolyl)ginkgolide C

10 1) *1-O-(tert-Butyldiphénylsilyl)ginkgolide C (3)*
4,4 g (10 mmol) de ginkgolide C et 4,1 g (60 mmol) d'imidazole sont mis en solution dans 10 ml de DMF sec. On y ajoute alors 8,3 ml (30 mmol) de chlorure de tert-butyldiphénylsilyle dans 3 ml de DMF. Après 2 jours d'agitation à température ambiante, le mélange réactionnel est hydrolysé
15 avec une solution aqueuse saturée en NH₄Cl et extrait à l'acétate d'éthyle. Les extraits sont lavés une fois avec une solution saturée en NH₄Cl et deux fois avec une solution saturée en NaCl. Après séchage sur MgSO₄ et évaporation des solvants, le mélange brut est séparé par flash chromatographie sur silice avec un éluant AcOEt/Pentane (7:3; 6:4). On récupère ainsi 2,6 g de ginkgolide
20 silylé (3). Rendement : 79 %, R_f = 0,15 (Pentane/AcOEt, 7:3). C₃₆H₄₂O₁₁Si (678,8).

2) Réaction d'arylation du dérivé (3)

A une solution de 0,2 g (0,295 mmol) de ginkgolide silylé (3) dans
25 2 ml de CH₂Cl₂ sous azote, on ajoute le diacétate de tris(p-tolyl)bismuth (2) (1 équivalent) et le diacétate de cuivre (0,1 équivalent). Après 24 heures, un second équivalent de (2) est ajoutée. Toutes les 24 heures pendant 5 jours, 1 équivalent de (2) est rajouté.

En fin de réaction, le mélange est hydrolysé par une solution
30 d'HCl 3N et est extrait au dichlorométhane. Les extraits sont séchés sur MgSO₄ et concentrés sous vide. Le mélange réactionnel est purifié par

chromatographie sur silice avec un mélange AcOEt/Pentane (2:8 ; 3:7). R_f 6 = 0,24 ;

3) 7-O-(*p*-Tolyl)-ginkgolide (5)

Sous agitation, 80 mg (0,1 mmol) de composé préparé selon l'étape 2), en solution dans 1,5 ml de THF sont traités par 65 mg (0,2 mmol) de fluorure de tétrabutylammonium en solution dans 1 ml de THF. Après 2 h, le milieu réactionnel est hydrolysé par 3 ml d'une solution aqueuse saturée en NaCl et ensuite extrait à l'AcOEt (4 fois 5 ml). Les extraits sont séchés sur MgSO₄. Après évaporation, le mélange brut est chromatographié sur colonne de silice avec un mélange AcOEt/Pentane (4:6 et 5:5). On récupère 40 mg (72 %) de (5). R_f = 0,35 (AcOEt/Pentane, 5:5) C₂₇H₃₆O₁₁ (530,5). Anal. Calc. : C 61,13 ; H 5,70 ; Exp. : C 61,12 ; H 5,76.

EXEMPLE 3 :

15 Propriétés cardioprotectrices du 7-O-(*p*-Tolyl)-ginkgolide C

L'effet du 7-O-(*p*-Tolyl)-ginkgolide C sur la récupération fonctionnelle cardiaque a été testé sur un modèle de cœur de rat isolé perfusé en mode isovolumique. Les coeurs ont été prélevés sur des rats mâles WISTAR (d'environ 350 g) préalablement anesthésiés, puis rapidement perfusés en mode rétrograde aortique à une pression constante de 100 cm H₂O. Le milieu de perfusion est une solution de Krebs-Henseleit à 37° C (pH 7,35), qui contient 10 mM de glucose et 2,5 mM de CaCl₂. Une incision dans l'artère pulmonaire permet l'écoulement de flux coronarien, et la mesure du débit coronaire en fonction du temps.

Après ablation de l'oreillette gauche, un ballonet de latex est inséré dans le ventricule gauche, puis rempli d'eau distillée de manière à obtenir une pression diastolique de contrôle (période normoxique) comprise entre 8 et 12 mm Hg. Le ballonet est relié à un capteur de pression, lui-même relié à un enregistreur-différentiateur (GOULD®), ce qui permet l'analyse des paramètres hémodynamiques suivants : pressions télodiastolique et développée P, fréquence cardiaque et dérivée première de la pression dP/dt.

Après une période de contrôle normoxique de 30 minutes (figure 1), les coeurs ont été soumis à une séquence d'ischémie/reperfusion constituée d'une ischémie partielle de 10 minutes, suivie d'une ischémie totale de 30 minutes et d'une reperfusion de 60 minutes. L'ensemble des paramètres hémodynamiques et le débit coronaire ont été mesurés toutes les 5 minutes au cours de ce protocole.

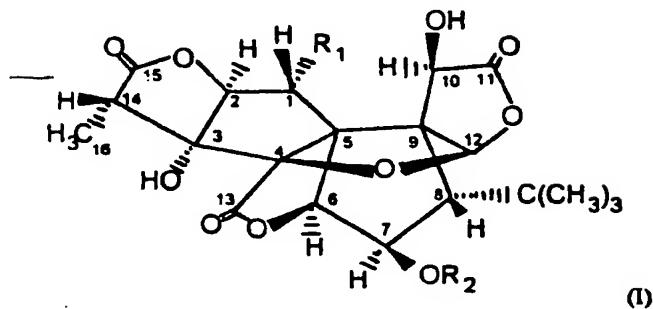
Le ginkgolide B et le 7-O-(p-Tolyl)-ginkgolide C ont été perfusés dans les mêmes conditions au cours des 10 dernières minutes de la période de contrôle, la totalité de l'ischémie partielle et le début de la reperfusion (voir 10 phase (a) sur la figure 1), et tous deux à la concentration de 150 ng/ml. Les résultats obtenus montrent que le 7-O-(p-Tolyl)-ginkgolide C induit un effet cardioprotecteur significativement supérieur à celui du ginkgolide B. Ce comportement avantageux du ginkgolide selon l'invention se traduit en particulier par une diminution significative du développement de la contracture 15 ischémique et post-ischémique (pression télédiastolique intraventriculaire gauche) et par une amélioration significative de la récupération du travail cardiaque à la reperfusion.

Le protocole choisi est un peu plus sévère (30 minutes d'ischémie totale au lieu de 20 minutes) que celui qui avait permis de démontrer les 20 propriétés cardioprotectrices des ginkgolides A et B, ainsi que du Bilobalide (S. PIETRI et al., (1997), J. Mol. Cell. Cardiol. 29 ; 733-742).

De plus, des expériences en parallèle, visant à déterminer la concentration minimale de 7-O-(p-tolyl)-ginkgolide capable d'induire des dysfonctionnements cardiaques en période de contrôle préischémique ont été 25 réalisées. A cet effet il a été perfusé des concentrations croissantes dans le myocarde normoxique. Aucun problème hémodynamique n'a été décelé jusqu'à 1 500 µg/ml. Ceci laisse supposer que des expériences de cardioprotection peuvent être effectuées en toute sécurité à ces concentrations.

REVENDICATIONS

1. Composé de formule générale I



5

dans laquelle :

- R₁ représente un atome d'hydrogène ou un groupement hydroxyle,
- R₂ représente un groupement aromatique en C₅ à C₁₂ comprenant le cas échéant un ou plusieurs hétéroatomes choisis parmi l'oxygène, l'azote, le soufre et éventuellement substitué par un ou plusieurs groupements choisis parmi les :
- atomes d'halogène comme le fluor, le chlore, le brome et l'iode,
- groupements hydroxyle, alkyle en C₁ à C₇, linéaire ou ramifié, alkoxy en C₁ à C₇, linéaire ou ramifié, alcényle en C₂ à C₆,
- groupement (CH₂)_nX avec n représentant un entier compris entre 0 et 5 et X représentant un groupement choisi parmi :
 - NR₃R₄ avec R₃ et R₄ représentant indépendamment l'un de l'autre un atome d'hydrogène, un groupement alkyle en C₁ à C₇ ou un groupement phényle,
 - les groupements CN, CHO, CF₃, SR₅ avec R₅ représentant un atome d'hydrogène, un groupement alkyle en C₁ à C₇ ou un phényle et
 - un groupement OR₆ avec R₆ répondant à la définition de R₅ ou un groupement P(O)(OR₇)(OR₈) avec R₇ et R₈ représentant indépendamment l'un

de l'autre un atome d'hydrogène ou un groupement alkyle C₁ à C₇.

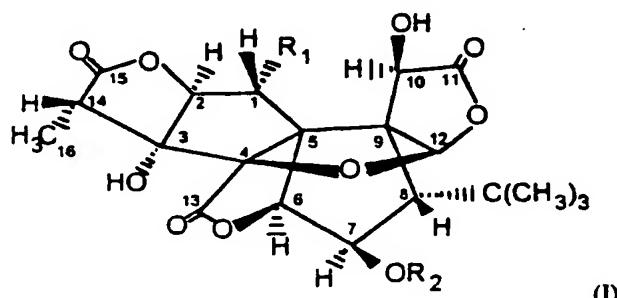
2. Composé selon la revendication 1 caractérisé en ce que R₂ 5 représente un groupement phényle, 1- ou 2-naphthyle ou biphenyle, substitués conformément à la revendication 1.

3. Composé selon la revendication 1 ou 2 caractérisé en ce que R₂ représente un groupement phényle substitué par au moins un groupement alkyle en C₁ à C₇, linéaire ou ramifié, un groupement alkoxy en C₁ à C₅ linéaire 10 ou ramifié ou un groupement (CH₂)_nOR₆ avec n étant un entier variant de 1 à 5 et R₆ représentant un groupement P(O)(OR₇)(OR₈) dans lequel R₇ et R₈ représentent indépendamment l'un de l'autre un atome d'hydrogène ou un groupement alkyle en C₁ à C₇.

4. Composé selon l'une des revendications 1, 2 ou 3 caractérisé 15 en ce que le groupement R₁ représente un groupement hydroxyle.

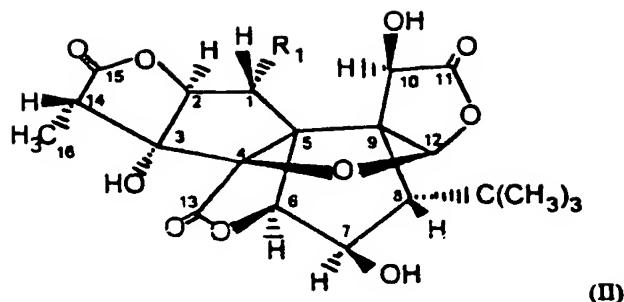
5. Composé selon l'une des revendications 1 à 4 caractérisé en ce qu'il s'agit du 1,3,10-trihydroxy-7-(4-méthylphénoxy) ginkgolide.

6. Procédé de préparation d'un composé de formule générale I



telle que définie en revendication 1 à 5, caractérisé en ce qu'il met en œuvre à titre de produit de départ un composé de formule générale II

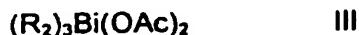
16



dans laquelle R_1 représente un atome d'hydrogène ou un groupement hydroxyle.

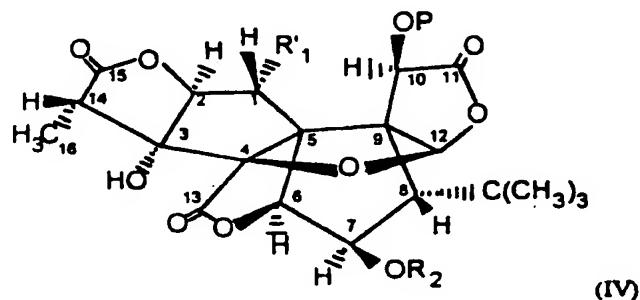
et comprend les étapes consistant à :

- protéger au moins une des fonctions hydroxyles en position 1 et/ou 10 par un groupement protecteur labile,
- transformer la fonction hydroxyle en position 7 du composé protégé obtenu à l'issue de l'étape 1 avec un diacétate de tris(aryl)bismuth de formule III



dans laquelle R_2 est tel que défini en formule générale I, dans des conditions opératoires telles que l'on obtient un composé de formule générale IV

15



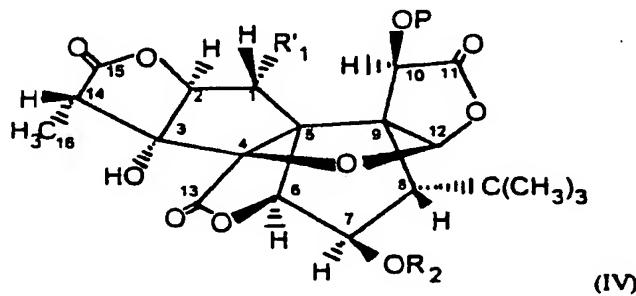
dans laquelle R'_1 représente un atome d'hydrogène ou un groupement OP' avec P et P' , identiques ou différents, représentant soit un atome d'hydrogène ou un groupement protecteur labile ou constituant ensemble un groupement protecteur labile bifonctionnel et R_2 est tel que défini en formule générale I :

- éliminer le groupement protecteur de la fonction hydroxyle en position 1 et/ou 10 et
- isoler le composé de formule générale I attendu.

7. Procédé selon la revendication 6 caractérisé en ce que la réaction du composé de formule III avec le composé de formule II dont au moins l'une des fonctions hydroxyles en position 1 ou 10 est protégée, est réalisée dans un solvant non polaire ou peu polaire en présence d'une quantité catalytique efficace de cuivre métal ou de sels de cuivre (II).

8. Procédé selon la revendication 6 ou 7 caractérisé en ce que le composé de formule III est introduit à raison de 1 à 7 équivalent de composé de formule générale II protégé.

9. Composé de formule générale IV



15 dans laquelle

- R', représente un atome d'hydrogène ou un groupement OP' avec P et P', identiques ou différents, représentant soit un atome d'hydrogène ou un groupement protecteur labile ou constituant ensemble un groupement protecteur labile bifonctionnel et
- 20 - R₂ représente un groupement aromatique en C₅ à C₁₂ comprenant le cas échéant un ou plusieurs hétéroatomes choisis parmi l'oxygène, l'azote, le soufre et éventuellement substitué par un ou plusieurs groupements choisis parmi les :

- atomes d'halogène comme le fluor, le chlore, le brome et l'iode,
- groupements hydroxyle, alkyle en C₁ à C₇, linéaire ou ramifié, alkoxy en C₁ à C₇, linéaire ou ramifié, alcényle en C₂ à C₆,
- groupement (CH₂)_nX avec n représentant un entier compris entre 0 et 5 et X représentant un groupement choisi parmi :
 - NR₃R₄ avec R₃ et R₄ représentant indépendamment l'un de l'autre un atome d'hydrogène, un groupement alkyle en C₁ à C₇, ou un groupement phényle,
 - les groupements CN, CHO, CF₃, SR₅ avec R₅ représentant un atome d'hydrogène, un groupement alkyle en C₁ à C₇, ou un phényle,
 - un groupement OR₆ avec R₆ répondant à la définition de R₅ ou un groupement P(O)(OR₇)(OR₈) avec R₇ et R₈ représentant indépendamment l'un de l'autre un atome d'hydrogène ou un groupement alkyle C₁ à C₇.

à titre d'intermédiaire de synthèse des composés de formule générale I selon l'une des revendications 1 à 5.

20 10. Composition pharmaceutique caractérisée en ce qu'elle comprend à titre de principe actif au moins un composé de formule générale I selon l'une des revendications 1 à 5.

1/1

